

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**2.3.7.8- TETRAKLORODİBENZO-*p*-DİOKSİN İLE
SIÇAN BEYNİNDE OLUŞTURULAN OKSİDATİF
HASAR ÜZERİNE MELATONİNİN ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Dilek ARSLAN

Anabilim Dalı: Biyoloji
Programı: Genel Biyoloji

TEMMUZ-2010

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**2.3.7.8- TETRAKLORODİBENZO-*p*-DİOKSİN İLE SIÇAN BEYNİNDE
OLUŞTURULAN OKSİDATİF HASAR ÜZERİNE MELATONİNİN ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Dilek ARSLAN
(07110102)**

**Anabilim Dalı: Biyoloji
Programı: Genel Biyoloji**

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ahmet ATEŞSAHİN

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 04 Haziran 2010

TEMMUZ-2010

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**2,3,7,8- TETRAKLORODİBENZO-*p*-DİOKSİN İLE SIÇAN BEYNİNDE
OLUŞTURULAN OKSİDATİF HASAR ÜZERİNE MELATONİNİN ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Dilek ARSLAN
(07110102)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 04 Haziran 2010

Tezin Savunulduğu Tarih: 16 Haziran 2010

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ahmet ATEŞŞAHİN (F.Ü)
Diğer Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Kadir SERVİ (F.Ü)
Prof. Dr. Orhan ERMAN (F.Ü)
Prof. Dr. Saadettin TANYILDIZI (F.Ü)
Doç. Dr. Engin ŞAHNA (F.Ü)

TEMMUZ-2010

*Çok Değerli Hocam
Prof. Dr. Ahmet ATEŞŞAHİN'e...*

ÖNSÖZ

Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisansımın yürütülmesini sağlayan, kendisinden her anlamda çok şey öğrendiğim, desteğini her zaman yanımda hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Ahmet ATEŞŞAHİN'e, tez çalışmalarım sırasında sağladığı katkı ve motivasyondan dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında bana sağladığı desteklerden dolayı Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Kadir Servi ve diğer öğretim üyelerine teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimim süresince yardım ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Engin ŞAHNA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Yine çalışmalarım esnasında bana her türlü desteği sağlayan Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Harun EVREN'e ve Prof. Dr. Orhan ERMAN'a teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım sırasında emeği geçen ve her zaman yanımda olan araştırma görevlisi arkadaşım Burcu Gül'e çok teşekkür ederim.

Her türlü kararında arkamda duran ve beni destekleyen aileme de çok teşekkür ederim.

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (FÜBAP) tarafından 1840 no'lu proje olarak desteklemiştir. Çalışmaya sağladıkları maddi destekten dolayı FÜBAP'a teşekkür ederim.

Dilek ARSLAN

Elazığ-2010

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	IV
SUMMARY.....	V
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	VII
SEMBOLLER LİSTESİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Dioksin Ve Benzeri Bileşikler	1
1.1.1. Dioksinler ve Tarihteki Önemi.....	1
1.1.2. Dioksin Çeşitleri ve Toksik Güçleri	1
1.1.3. Çevrede TCDD ve İlişkili Kimyasallar	2
1.1.4. TCDD'nin Toksik ve Biyolojik Etkileri	4
1.1.5. Etki Mekanizması.....	4
1.1.5.1. TCDD'nin Hücreye Girişi.....	4
1.1.5.2. Reseptör Protein Olarak Aril Hidrokarbon Reseptörleri	5
1.1.5.3. Tür ve Doku Spesifitesi	5
1.1.5.4. Hücre İçi Lokalizasyonu	5
1.1.5.5. Ah Reseptörünün Transformasyonu ve Etki Şekli.....	6
1.1.6. Dioksinlerin Toksikokinetikleri	6
1.1.6.1. Emilim ve Atılım.....	6
1.1.6.2. Dağılım	8
1.1.6.3. Metabolizma.....	8
1.1.7. Dioksinlerin Toksisiteleri.....	8
1.1.7.1. Akut Toksisite	8
1.1.7.2. Kronik Toksisite.....	9
1.1.7.3. Özel Toksik Etkiler.....	9
1.1.7.3.1. Mutajenik Etkiler.....	9
1.1.7.3.2. Karsinojen Özellikleri.....	9

1.1.7.3.3.	Çeşitli Organ Toksisitesi.....	10
1.1.7.3.4.	İmmunotoksik Etkiler.....	10
1.2.	Dioksinler ve Oksidatif Stres.....	10
1.2.1.	Antioksidanlar.....	11
1.3.	Melatonin.....	12
1.4.	Amaç.....	14
2.	MATERYAL VE METOT.....	15
2.1.	MATERYAL.....	15
2.1.1.	Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	15
2.1.2.	Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	15
2.1.3.	Deney Hayvanları.....	16
2.1.3.1.	Deney Grupları.....	17
2.1.4.	Örneklerin Alınması ve Hazırlanması.....	17
2.1.4.1.	Homojenatların Hazırlanması.....	17
2.2.	Metot.....	18
2.2.1.	Beyin Dokusu MDA Düzeylerinin Ölçümü.....	18
2.2.2.	Beyin Dokusu Redükte GSH Düzeylerinin Ölçümü.....	19
2.2.3.	Beyin Dokusu CAT Aktivitesi Ölçümü.....	21
2.2.4.	Protein Ölçümü.....	21
2.2.5.	İstatistiksel Analiz.....	22
3.	BULGULAR.....	23
3.1.	Canlı Ağırlık ve Makroskopik Bulgular.....	23
3.2.	Biyokimyasal Parametreler.....	23
3.2.1.	Beyin Dokusu MDA Düzeyleri.....	23
3.2.2.	Beyin Dokusu Redükte GSH Düzeyleri.....	24
3.2.3.	Beyin Dokusu CAT Aktiviteleri.....	25
4.	TARTIŞMA.....	27
5.	SONUÇ.....	30
6.	KAYNAKLAR.....	31
7.	ÖZGEÇMİŞ.....	39

ÖZET

Bu çalışmada ratlarda subakut 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-*p*-dioksin (TCDD)'in beyin dokusu üzerine toksik etkileri ve bu etkilere karşı melatoninin muhtemel koruyuculuğunun araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada 230-250 g ağırlığında 28 adet Sprague-Dawley ırkı erkek rat her grupta 7 adet olacak şekilde 4 gruba ayrılmış ve deney süresi 30 gün olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu hayvanlara TCDD'nin çözücüsü olan 0,5 ml mısır yağı gavajla ve melatonin uygulamasıyla orantılı olarak 0,5 ml sıvı (9 kısım fizyolojik serum + 1 kısım etil alkol) periton içi (ip) verilmiştir. İkinci gruba (Melatonin grubu) 5 mg/kg melatonin (ip), üçüncü gruba (TCDD grubu) 500 ng/kg TCDD ve dördüncü gruba (TCDD+Melatonin) aynı dozlarda TCDD ile eş zamanlı melatonin uygulanmıştır. Son ilaç uygulamasından 24 saat sonra ratlar dekapite edilerek biyokimyasal analizler için beyin dokuları çıkarılmıştır. Beyin dokusu malondialdehit (MDA) ve redükte glutatyon (GSH) düzeyleri ile katalaz (CAT) aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Çalışma süresi boyunca kontrol, melatonin ve TCDD grubu ratlarda başlangıç ağırlıkları ile deneylerin sonunda ölçülen ağırlıklar arasında bir artış ($p<0,05$) belirlenmiş olmasına karşılık TCDD+Melatonin grubunda ise deneylere başlanan ağırlıklarda herhangi bir değişiklik meydana gelmemiştir. MDA düzeyinin TCDD grubunda arttığı ($p<0,001$) ve melatonin uygulamasının bu değeri azalttığı belirlenmiştir. TCDD grubunda GSH düzeylerinin, kontrol grubuna göre azaldığı ve eşzamanlı melatonin verilen grupta ise normal seviyelere geldiği görülmüştür. Beyin dokusu CAT aktivitelerinin ise tüm gruplarda uygulamalardan etkilenmediği ($p>0,05$) tespit edilmiştir.

Sonuç olarak TCDD'nin muhtemelen serbest radikal oluşumunu artırarak MDA düzeylerinde artışlara, GSH düzeylerinde ise azalmalara neden olduğu, buna karşılık antioksidan özellikleri iyi bilinen melatoninin ise bu parametrelerde iyileşmelere neden olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Dioksin, Oksidatif Stres, Antioksidan, Melatonin, Rat, Beyin.

SUMMARY

The Effects of Melatonin Against 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin induced Oxidative Damage in Rat Brain

The aim of this study was to investigate toxic effects of subacute TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin) applications and possible protection of melatonin against these effects on brain in rats.

A total of 28 male Sprague-Dawley rats weighing between 230-250 g were used in present study. Rats were divided into four groups, each group including seven rats and the experimental period was 30 days. The control group was treated 0,5 ml corn oil by gavage and 0,5 ml liquid proportionally melatonin administration (9 parts physiological serum +1 part ethyl alcohol) intraperitoneally. 5 mg/kg dose of melatonin was applied intraperitoneally for Group 2 (Melatonin group), Group 3 (TCDD group) was given 500 ng/kg TCDD and Group 4 (co-administration TCDD and melatonin) was treated with TCDD (500 ng/kg) and melatonin (5 mg/kg) simultaneously. After 24 hours the last drug application rats were decapitated and their brain tissues were removed for biochemical analysis. The brain tissue malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH) levels and catalase (CAT) activities were measured spectrophotometrically.

During the study period although there was determined significant increase starting weight with after experiments weight ($p < 0.05$) in control, melatonin and TCDD groups, there was no changes in TCDD+Melatonin group. MDA levels increased in TCDD group ($p < 0.001$) and melatonin treatment reduced this value. GSH levels decreased in TCDD group compared to control group and normalized in melatonin treated group simultaneously. Brain tissue CAT activities were not affected ($p > 0.05$) in all groups.

In conclusion, this study showed that TCDD caused increased MDA levels, decreased GSH levels by increased possible occurring free radical. However, well known antioxidant properties endogen melatonin may be amelioration in these parameters.

Key words: Dioxin, Oxidative Stress, Antioxidant, Melatonin, Rat, Brain.

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Kuzey Amerika’da değişik kaynaklardan dioksin alımı.	7
Şekil 2. MDA kalibrasyon eğrisi	19
Şekil 3. Redükte GSH kalibrasyon eğrisi	20
Şekil 4. Gruplara ait beyin dokusu MDA düzeyleri	24
Şekil 5. Gruplara ait beyin dokusu redükte GSH düzeyleri.....	25
Şekil 6. Gruplara ait beyin dokusu CAT aktiviteleri.....	26

TABLolar LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) Belirlemiş Olduğu TEF Değerleri	3
Tablo 2. Çalışmada kullanılan ratlara verilen yemin besin madde bileşimi.....	16
Tablo 3. Araştırmaya alınan ratların canlı ağırlıkları.....	23

SEMBOLLER LİSTESİ

AHR	: Aril Hidrokarbon Reseptörü
CAT	: Katalaz
DTNB	: 5,5'-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit
EPA	: Çevre Koruma Derneği
GSH	: İndirgenmiş Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
G6PD	: Glutasyon-6-fosfat dehidrogenaz
IARC	: Kanser Araştırma Merkezi
KCl	: Potasyum klorür
MDA	: Malondialdehit
PCB	: Poliklorlu bifeniller
PCDD	: Poliklorlu dibenzo dioksinler
PCDF	: Poliklorlu dibenzofuranlar
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
sAMP	: Siklik Adenozin Mono Fosfat
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TCA	: Trikloroasetik asit
TCDD	: Poliklorludibenzo-p-dioksin
TEF	: Toksik Etki Faktörü
TEQ	: Toksik Ekivalan

1. GİRİŞ

1.1. Dioksin ve Benzeri Bileşikler

1.1.1. Dioksinler ve Tarihteki Önemi

TCDD veya kimyasal olarak 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-*p*-dioksin, çevrede uzun süre kalıcılığı olan, yapısal olarak aynı mekanizmayla toksisitesini oluşturup canlılarda biyolojik olarak benzer etkiler gösterebilen geniş bir ailenin prototipidir. Dioksinler terimi polihalojenli dibenzo-*p*-dioksinler ve furanların yerine kullanılabilir. Bu bileşikler gerçekte herhangi bir amaç için üretilmeyip, endüstriyel üretim ve başta atık yakma gibi yanma işlemlerinin bir yan ürünü olarak doğaya salıverilirler. Aynı şekilde çeşitli amaçlar için üretilen polihalojenli bifeniller, naftalenler ve azo/azoksibenzenler de dioksin terimi içerisinde tanımlanabilmektedirler [1].

İlk olarak dioksin üretimi ve zehirlenmeleri 1827 yılında Almanya'da soda imalatında insan eliyle yapılmış bir kimyasal ürün olarak karşımıza çıkmaktadır [1]. En güçlü dioksin olarak kabul edilen TCDD ilk olarak Vietnam savaşında özellikle ormanların yok edilmesi amacıyla kullanılan herbisitlerden (Agent Orange) çevreye bulaştığı ve böylece daha iyi tanındığı bilinmektedir. Daha sonraları ise endüstriyel kazalar ve patlamalar sonucu ortaya çıktığı birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir [2,3]. Yine Japonya'da 1968 yılında dioksinlerle bulaşık yağları tüketen insanlarda subkronik dioksin zehirlenmesi (Yusho zehirlenmesi) [3,4], benzer şekilde Tayvan'da 1979 yılında Yucheng olayı [3,5,6] ve çeşitli yangınlarda bu tür zehirlenme olaylarına rastlanılmaktadır. Son zamanlarda ise en çok Ukrayna devlet başkanı Victor Yushchenko'nun 2004 yılında zehirlenmesiyle gündeme gelmiştir [3,7].

1.1.2. Dioksin Çeşitleri ve Toksik Güçleri

Dünya sağlık örgütü 7 poliklorlu dibenzo-*p*-dioksinler (PCDD), 10 poliklorlu dibenzofuranlar (PCDF) ve 12 poliklorlu bifeniller (PCB) olmak üzere toplam 29 bileşiği dioksin ya da dioksin benzeri madde olarak kabul etmektedir. Bu bileşikler genellikle aynı mekanizmalarla toksisitelerini oluşturmakta ancak toksisiteleri arasında oldukça farklılıklar

bulunmaktadır. Bu yüzden en toksik bileşik olarak kabul edilen TCDD esas alınarak diğer bileşiklerin Toksik Etki Faktörleri (TEF) hesaplanmıştır. TCDD'nin Etkili Doz 50 (ED50)'sinden yararlanılarak elde edilen sonuçlar diğer dioksin benzeri bileşikler için uyarlanmıştır. TCDD için TEF değeri 1 olarak kabul edilmekte ve diğer dioksin benzeri bileşikler için (1,2,3,7,8 PCDD hariç, TEF değeri 1) bu değerlerin 1'den düşük olduğu kabul edilmektedir. Eğer dioksin benzeri bileşikler saf olarak değil de bir karışım halinde bulunurlar ise bunların TEF değerleri karışımın içerisindeki maddelerin konsantrasyonlarının belirlenmesi ve böylece her dioksin için ayrı TEF değerleri yerine karışımın toplam Toksik Ekivalanı (TEQ) olarak kullanılması daha uygun olabilmektedir [1,8]. Dioksin ve benzeri bileşiklere ait TEF değerleri Tablo 1'de sunulmuştur [3].

1.1.3. Çevrede TCDD ve İlişkili Kimyasallar

Dioksin terimi günümüzde özellikle medya tarafından sıkça gündeme getirilmekte ve genel olarak 2,3,7,8 poliklorludibenzo-*p*-dioksinin kısaltılmışı olarak kullanılmaktadır. Ancak TCDD 75 üyeli poliklorludibenzo-*p*-dioksin ailesinin sadece bir üyesi ama en toksik olanıdır. Aralarındaki farklılıkları ise yapılarında bulunan klor atomlarının sayısı ve yerleştiği yerlere göre değişmektedir. Günümüzde dioksin benzeri etkinlik gösterebilen 75 PCDD, 135 PCDF ve 20 PCB bileşiği çevrede tespit edilmiş ve iyi bir şekilde tanımlanmışlardır [9].

Tablo 1. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) Belirlemiş Olduğu TEF Değerleri

		TEF Değerleri
Dioksinler	2,3,7,8-Tetra-CDD	1
	1,2,3,7,8-Penta-CDD	1
	1,2,3,4,7,8-Hekza-CDD	0.1
	1,2,3,6,7,8-Hekza-CDD	0.1
	1,2,3,7,8,9-Hekza-CDD	0.1
	1,2,3,4,6,7,8-Hepta-CDD	0.01
	OCDD	0.0001
Dibenzofuranlar	2,3,7,8-Tetra-CDF	0.1
	1,2,3,7,8-Penta-CDF	0.05
	2,3,4,7,8-Penta-CDF	0.5
	1,2,3,4,7,8-Hekza-CDF	0.1
	1,2,3,6,7,8-Hekza-CDF	0.1
	1,2,3,7,8,9-Hekza-CDF	0.1
	2,3,4,6,7,8-Hekza-CDF	0.1
	1,2,3,4,6,7,8-Hepta-CDF	0.01
	1,2,3,4,7,8,9-Hepta-CDF	0.01
	OCDF	0.0001
PCBler	3,3',4,4'-TCB	0.0001
	3,4,4',5-TCB	0.0001
	3,3',4,4',5-PeCB	0.1
	3,3',4,4',5,5'-HxCB	0.01
	2,3,3',4,4'-PeCB	0.0001
	2,3,4,4',5-PeCB	0.0005
	2,3',4,4',5-PeCB	0.0001
	2'3,4,4',5- PeCB	0.0001
	2,3,3',4,4',5-HxCB	0.0005
	2,3,3',4,4',5'-HxCB	0.0005
	2,3',4,4',5,5'-HxCB	0.00001
	2,3,3',4,4',5,5'-HpCB	0.0001

1.1.4. TCDD'nin Toksik ve Biyolojik Etkileri

TCDD'nin kimyasal olarak yağda eriyebilen, reaktif ve nonpolar moleküler özellikleri, bu maddeyi hem sulu hem de yağlı ortamlardan biyolojik olarak konsantre edebilmemize imkan sağlamaktadır. Kemiricilerde yarılanma ömürleri haftalarla ifade edilirken [9,10] insanlarda bu sürelerin yıllar aldığı bildirilmektedir (tek doz uygulamasını takiben 5,8 yıl) [9]. Bu maddelerin biyolojik ve toksik etkileri birçok faktöre bağlıdır. Bunlar kimyasala ait faktörlerden toksik maddenin dozu ve uygulama yolu ile canlıya ait faktörlerden hayvanın türü, yaşı, ırkı ve cinsiyetidir [9,12,13]. En ilginç yönü türler arası duyarlılıktaki farklılıklardır. Örneğin kemiriciler arasında 2500 kat gibi çok yüksek oranda öldürücü doz 50 (LD50) değerlerinin farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Şaşırtıcı olan durum ise akut TCDD toksisitesinde ölümlerin hemen görülmemesi ve hayvanların anoreksiye bağlı olarak birkaç günle birkaç hafta içerisinde kötüleşmeleridir. Gıda alımının azalmasıyla ilgili TCDD'nin direk bir etkisinin olmadığı ancak çok fazla bilginin de literatürde yer almadığı bilinmektedir [9,13].

1.1.5. Etki Mekanizması

Hayvanlarda TCDD'nin biyolojik ve toksik etkilerinin oluşumunda bu maddenin proteinler veya nükleik asitlerle birleşerek DNA'daki oluşturduğu hasarlar için doğrudan bir mekanizma ortaya konulmamıştır [9,14]. Ancak TCDD'nin toksik etkilerini özel bir protein olan aril hidrokarbon reseptörü (AhR) aracılığıyla oluşturduğu gösterilmiştir. Bu reseptör aracılığıyla meydana getirilen toksik etkinin mekanizmaları toksik maddenin hücreye girişi, Ah reseptörüne bağlanma, reseptör-ligand kompleksinin DNA'ya bağlanması, spesifik genlerin oluşumu ve oluşan proteinlerin etki şekliyle açıklanabilir [9].

1.1.5.1. TCDD'nin Hücreye Girişi

TCDD'nin hücreye genel olarak basit difüzyonla girdiği kabul edilmektedir. Tek başına basit difüzyon ile dioksinlerin hücreye girişleri ile ilgili bilgiler yetersiz kalmakta ancak aktif transport yoluyla da hücreye girişle ilgili deliller yeterince açıklığa kavuşturulamamıştır. TCDD'nin hücre büyümesini uyardığı, karaciğerde yağ birikimi ve epidermal hücrelerde hiperplastik proliferatif etkilerinin olduğu bildirilmiştir. TCDD

toksistesinde hücre membranının önemli bir yere sahip olduğu ve özellikle membran ATPaz aktivitesinde azalmalara yol açabildiği gösterilmiştir. Yine TCDD'nin epidermal büyüme faktörünü etkileyerek hücrelerde bu faktörün etkilediği reseptörlerin sayısında artışlara neden olduğu ve sonuçta TCDD'nin dermal toksisitesinin bu olaya bağlanabileceği bildirilmektedir [9].

1.1.5.2. Reseptör Protein Olarak Aril Hidrokarbon Reseptörleri

Belirli steroid hormonların etki mekanizmasına benzer şekilde TCDD plazma membranını çapraz olarak geçer ve sitozolde Ah reseptörlerine bağlanır. Sitozoldeki bu bağlanma reseptörün transformasyonunu indükleyerek onun çekirdeği ve dolayısıyla DNA'yı etkileyebilecek hale sokmaktadır. Bu deliller TCDD'lerin toksik ve biyolojik etkilerini Ah reseptörleri vasıtasıyla gösterdiğini açıklayabilmektedir [9,15].

1.1.5.3. Tür ve Doku Spesifitesi

Ah reseptörleri memeli ve memeli olmayan birçok türde radyoaktif maddeyle işaretlenerek belirlenmiştir. Bu reseptörlerin kemiricilerde, tavşan, koyun, kedi, sincap, belirli kuşlar ve primatlarda yüksek düzeylerde aktivite gösterdiği, buna karşın kurbağa, sığır, tırtıl, hindi, güvercin ve somon balıklarında ise tespit edilebilecek düzeylerde olmadığı bildirilmektedir [9]. Son zamanlarda insanlarda yapılan çalışmalarda Ah reseptörlerinin akciğer, karaciğer, böbrek ve plasenta gibi doku ve hücre kültürlerinde belirlendiği ortaya konulmuştur [9,16]. Ratlarda ise timus, akciğer, karaciğer, böbrek, testis, iskelet kası ve beyinde tespit edilmişken, pankreas, böbrek üstü bezi ve prostat dokusunda ise belirlenememiştir [9,17].

1.1.5.4. Hücre İçi Lokalizasyonu

Ah reseptörünün asıl olarak sitozolde yer aldığı, buna karşın reseptör–ligand kompleksinin ise çekirdekte yer aldığı bildirilmiştir. Bazı araştırmacılar ise bu reseptörlerin hem sitozolde hem de çekirdekte lokalize olabildiğini bildirmektedirler. Steroid hormonlarda olduğu gibi reseptör–ligand kompleksi çekirdeğe böylece geçer ve DNA üzerine etkilerini gösterebilir [9].

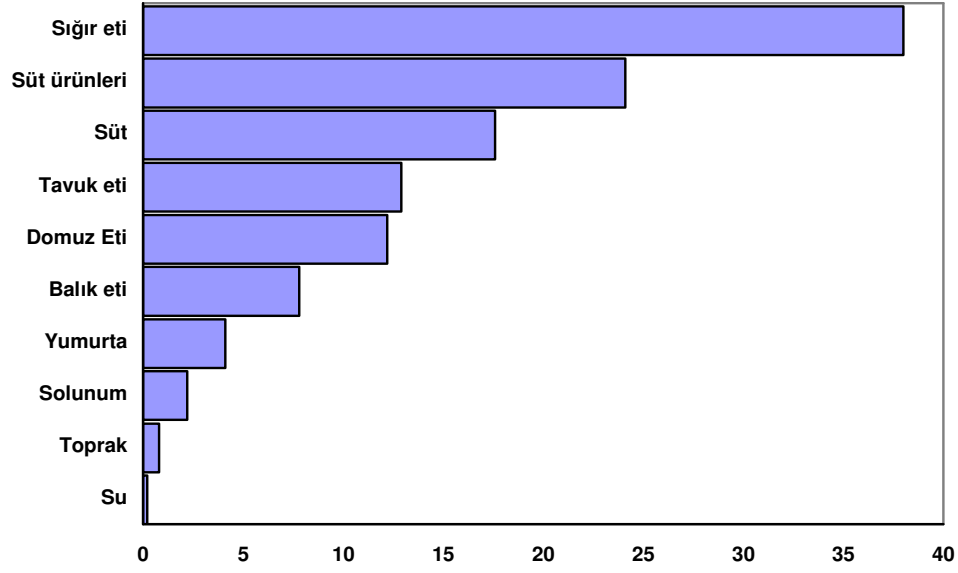
1.1.5.5. Ah Reseptörünün Transformasyonu ve Etki Şekli

TCDD'nin yokluğunda Ah reseptörleri biyolojik olarak inaktif formda varlıklarını sürdürmektedirler. TCDD ile karşılaşma durumunda ise bu bileşikle sitoplazmadan çekirdeğe geçmeleri halinde DNA ile spesifik olarak etkileşim gösterebilen bir reseptör halini alabilmektedirler [9,18]. Ah reseptörü-ligand kompleksi DNA'ya bağlanır ve CYP1A1 geninin transkripsiyonunu uyaran gen değiştirici olarak etkilerini gösterirler. Bu olay çok hızlı bir şekilde meydana gelir ve protein sentezini de önemli ölçüde inhibe edebilmektedir [9,19]. Sitokrom enzimlerinden CYP1A1 geni dioksinlere cevabı artırıcı fonksiyonlara sahip unsurlar olarak görülmektedir [9,20]. TCDD ve benzeri bileşiklere karşı toksisitedeki farklılıkların asıl sebebi, hayvanlardaki Ah reseptörlerinin tür ve yaşa göre farklılıklar göstermesi ve hücredeki DNA düzeyleri ile ilişkilidir. İnsanların kemiricilere göre bu maddelere karşı daha az duyarlı olduğu ve bu durumun da reseptör duyarlılıklarındaki farklılıklarından kaynaklandığı ileri sürülmektedir [9,21].

1.1.6. Dioksinlerin Toksikokinetikleri

1.1.6.1. Emilim ve Atılım

Havayla çevreye yayılan dioksinlerin çok önemli bir kısmı canlılara gıda zinciri yoluyla ulaşırlar. Dioksinlerin gıdalarla alımında en önemli faktör bu maddelerin yağda iyi, suda çok az çözünmesidir. Kuzey Amerika'da yaşayan insanlar tarafından gıda zinciri yoluyla alınan dioksinlerin vücuda giriş yolları Şekil 1'de gösterilmiştir [22].



Şekil 1. Kuzey Amerika'da değişik kaynaklardan dioksin alımı (toplam 119 pg/gün).

Dioksinler insan ve hayvanlarda başlıca ağızdan olmak üzere deri ve solunum yoluyla alınmakta ve emilmektedirler [23]. Mide-bağırsak kanalından dioksinlerin emilimi onların içerdiği klor atomuyla ilişkili olup 4, 5 ve 6 klor atomu içerenlerin iyi emildiği (%50-90 oranında olup taşıt maddeye bağımlı) ve 9-10 klor atomu içeren dioksinlerin ise daha az emilebildiği belirtilmiştir [24,25].

Dioksinlerin en önemli atılım yolu dışkıdır. Diliberto ve ark. ratlarda yaptıkları bir çalışmada uygulamadan 72 saat sonra alınan dioksinlerin %30-80'inin dışkı yoluyla atıldıklarını bildirmişlerdir [23,26]. İdrarla atılım ise belirlenememiştir. Hayvanlarda dioksinlerin asıl olarak biriktiği yer karaciğer ve yağ doku olup, bu birikme doza bağlı linear bir durum arz etmektedir. Ancak dioksinlerin emilimlerinde ise doza bağlı lineer bir durum söz konusu olmayabilmektedir. Solunum yoluyla alınan bu zehirlerin de iyi bir şekilde emildiği ve oral uygulamadakine benzer bir şekilde yağ doku ve karaciğerde birikim gösterdiği (sırasıyla %22 ve % 18) ve dışkıyla atıldıkları gösterilmiştir [23,27]. Deri yoluyla uygulama yapılan bir çalışmada ise 72 saat içerisinde uygulanan maddenin %12'sinin emildiğini, %13 ünün ise uygulama alanında kaldığını göstermişlerdir [23,28]. Bu yolla uygulamada ise yağ dokuya göre karaciğerde daha çok (3:2 oranında) biriktiği ve yine dışkı yoluyla atıldığı bildirilmiştir [24].

1.1.6.2. Dağılım

Emilen dioksinler kandan iskelet kaslarına, deriye, karaciğere ve yağ dokuya çabucak dağılmaktadır. En yüksek konsantrasyona karaciğerde ulaştıktan sonra yeniden dağılım göstererek yağ dokuya geçmektedir [23]. Kedderis ve ark. (1991) ratlarda tek doz çalışması olarak verilen 2 farklı dozda TCDD'nin (0,5 ve 50 µg/kg) küçük dozda kandan çok büyük bir kısmının 1 gün içerisinde temizlenebildiğini, 7 saatte karaciğerde en yüksek düzeylere çıktığını, yarılanma ömrünün 17 gün olduğunu, yağ dokuda ise yarılanmanın 58 gün olarak belirlendiğini ortaya koymuşlardır. Yüksek doz uygulamasında ise dozun 100 kat fazla olmasına karşın karaciğerde 700 kat daha yüksek düzeylerde tespit edildiği bildirilmiştir [23,29]. Dioksinlerin lipofilikliği ve metabolizmaya dirençliliği bu maddelerin yağ doku ve karaciğerde birikmesine yol açmaktadır [24,25].

1.1.6.3. Metabolizma

Ratlarda TCDD gibi bileşiklerin karaciğerde birikme özelliği gösterdikleri ve sitokrom p450 1A2 mikrozomal enzimlerine bağlandıklarını gösterilmiştir. Metabolizmanın en önemli belirtisi ise kimyasalın yapısındaki eşleşmemiş iki karbon atomunun mevcudiyeti olarak belirtilmektedir [24]. AhR'ye bağımlı sitokrom p450 1A1 ise diğer PCDD, PCDF ve PCB kongenerlerinin oksidatif metabolizmasıyla ilişkilidir [24,30].

1.1.7. Dioksinlerin Toksisiteleri

1.1.7.1. Akut Toksikite

Dioksinlerin LD50 değerleri bileşiğin kongenerine, türüne ve hayvana ait faktörlerden ırk ve türüne göre çok farklı aralıklarda olabilmektedir. En zehirli kongener olarak bilinen TCDD için laboratuvar ratlarında LD50 22-340 mg/kg gibi geniş bir aralıkta seyredilmektedir. Kobaylarda 0,6-2,1 mg/kg; hamsterlarda ise 1,157-5051 mg/kg olarak bildirilmektedir. Bu çalışmaların tümünde hayvanlarda Wasting sendromu denen kilo kaybı ile vücut yağının azalmasıyla karakterize bir şekilde ölümler görülmektedir. Tek doz

uygulanan hayvanların aynı zamanda kalp, karaciğer, böbrek, mide, kan ve endokrin sistemleri de ciddi bir şekilde etkilenmektedir [31].

1.1.7.2. Kronik Toksikite

Hayvan çalışmalarında oral yolla alınan dioksinlerin başta karaciğer, mide-bağırsak, kan, deri, vücut ağırlığı değişiklikleri, endokrin sistem, immun sistem, nörolojik, üreme ve gelişimle ilgili fizyolojik olayları etkileyebildiği gösterilmiştir [31]. Fare ve sıçanlarda kronik (90 günlük uygulama) dioksin uygulamalarında minimal etkinin 45 ng/kg dozlarında görülmeye başladığı ve özellikle reaktif oksijen türlerinde (ROS) artışlar meydana getirdiği bildirilmiştir [32].

1.1.7.3. Özel Toksik Etkiler

1.1.7.3.1. Mutajenik Etkiler

Dioksinlerin mutajenitesi ile ilgili çalışmalar tartışmalı bir hal göstermektedir. Endüstriyel dioksinlere maruz kalan annelerde, fetüsa ait dokularda kromozom kırılmaları gözlenirken, klorakne tedavisi gören hastalarda bu durum gözlenmemiştir. Aynı şekilde deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda da dioksinlerin güçlü genotoksik etkilerinin olduğuna dair belirtiler çok yoktur [31].

1.1.7.3.2. Karsinojen Özellikleri

Dioksinler Çevre Koruma Ajansı (EPA) ve Kanser Araştırma Merkezleri (IARC) tarafından Grup 2B (hayvan çalışmalarında yeterli delili olan, insanlarda yetersiz) kanserojen maddeler sınıfında bildirilmektedir [31]. Ratlarda yapılan çalışmalarda dioksin ve benzeri bileşiklerin çeşitli sarkom ve karsinomlarla karakterize kanser çeşitlerine neden oldukları gösterilmiştir. Epidemiyolojik çalışmalarda bu bileşiklerden etkilenen hayvanların kanserden ölüm ve bazı spesifik kanser çeşitlerinin (yumuşak doku karsinomu, hoşkin olmayan lenfoma, solunum yolu ve gastrointestinal kanserler) insidenslerinde önemli artışlar bildirilmektedir. Yine TCDD'nin tümör dokusunu ilerletici özelliğinin de olduğu bilinmektedir [31].

1.1.7.3.3. Çeşitli Organ Toksisitesi

İnsanlarda TCDD'ye maruz kalmanın en önemli belirtileri klorakne, hiperpigmentasyon, konjunktivitis ve mukoz zarların irritasyonu ile kendini gösteren deri toksisiteleridir. Karaciğerde TCDD ve benzeri bileşikler başta porfirinler ve hiperkolesterolemi ile birlikte serum enzimlerinde önemli artışlara neden olmaktadır. Karaciğer hasarı ve kütlelerinde artışlar yaparak açık bir şekilde hepatotoksik bir madde olarak kabul edilmektedir [24].

1.1.7.3.4. İmmunotoksik Etkiler

TCDD ve benzeri bileşiklerin immun sistemi baskılayıcı özellikte bir madde olduğu laboratuvar hayvanlarındaki çalışmalarda ortaya konulmuştur [33,34]. TCDD'nin sitozolik bir reseptör olan Ah reseptörü aracılığıyla immun sistemde baskıya yol açtığı ileri sürülmektedir [33].

1.2. Dioksinler ve Oksidatif Stres

Son yıllarda yapılan birçok çalışmada dioksinler ve oksidatif stresin birbirleriyle çok yakın ilişki kurduğu ve bu maddelerin canlılarda bu yolla toksik etkileri başlattığı bildirilmektedir. Oksidatif stresin hücresel bulgularından reaktif oksijen türlerinin etkisiyle lipidlerin peroksidasyonu, sülfidril gruplarının azalması, membran akıcılığının artması ve DNA zincir kırılmaları bu maddelere maruz kalan hayvanlarda açıkça ortaya konmuştur. Ayrıca birçok antioksidan maddenin deney ortamlarında dioksin ve benzeri bileşiklerin toksik etkilerini hafiflettikleri ve ölümleri azalttıkları belirtilmektedir [35].

Serbest radikaller son yörüngelerinde eşlenmemiş elektron taşıyan moleküllerdir [36]. Bu stabil olmayan bileşikler protein, lipid, karbonhidrat ve nükleik asit gibi moleküllerle etkileşmesini sağlayacak bir enerji meydana getirir. Serbest radikaller biyolojik sistemler üzerindeki en büyük hasarı reaktif oksijen türü (ROS) olarak da adlandırılan serbest oksijen radikalleri ile gerçekleştirirler. Bunların asıl meydana geldiği yer aerobik solunum yapan canlı hücreleridir. ROS, birçok ultraviyole ışınlar, metallerin yıkımlanması, çevresel kirleticilerin atmosferde bulunması ve canlılar tarafından alınması,

inflamasyon esnasında nötrofil ve makrofajlar tarafından, mitokondriyal elektron transport zinciri ve diğer çeşitli mekanizmalar tarafından oluşturulur [37,38].

ROS, hem oksijen radikalleri için hem de radikal olmayan türevleri için ortak kullanılan bir terimdir. Tüm oksijen radikalleri ROS olarak kabul edilmekte ancak tüm ROS ürünleri oksijen radikali olmayabilmektedir. Serbest radikal olarak kabul edilen ROS ürünleri süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil ($OH^{\cdot-}$), hidroperoksil (HO_3), peroksil (RO_2^{\cdot}), karbonat (CO_3) ve singlet oksijen (O_2) türevleri sayılabilmektedir. Radikal olmayan ama ROS'a neden olabilen maddelerin bazıları ise hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksinitrit ($ONOO^-$) reaktif klor türleri ve reaktif nitrojen türleridir [39].

Biyolojik sistemlerde ROS'un, hem yararlı hem de zararlı etkilerinin olduğu bilinmektedir [40,41]. ROS'un yararlı etkileri arasında çeşitli mikroorganizmalara karşı savunma ve çeşitli hücre içi sinyal sistemlerine karşı cevap oluşturmada fizyolojik rol oynaması bulunmaktadır. Ancak bunların yanında yüksek konsantrasyonlardaki ROS ise başta hücre membranındaki lipitler olmak üzere protein ve nükleik asitler gibi hücre yapılara zarar vermekte ve bu zarar oksidatif hasar olarak isimlendirilmektedir [42]. Vücutta bu zararlı etkiler antioksidan savunma mekanizması tarafından dengelenir [43]. Her ne kadar hücrede ROS'un meydana getirdiği oksidatif hasara karşı antioksidan savunma sistemleri yanıt oluştursa da hayat boyunca oksidatif hasar oluşmakta ve yaşlılık, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, nörodejeneratif bozukluklar ve çeşitli kronik hastalıklar gibi yaşa bağlı durumlar meydana gelmektedir [44].

1.2.1. Antioksidanlar

Antioksidan terimi stabilizasyon yeteneği olan ya da serbest radikallerin hücrelere vereceği muhtemel reaksiyonları önleyebilen moleküllerdir. İnsan ve hayvanlar birbirleriyle sinerjik olarak çalışan ve hücreleri serbest oksijenlerin hasarlarına karşı koruyabilen enzimatik ve enzimatik olmayan oldukça kompleks antioksidan sistemlere sahiptirler.

İdeal bir antioksidanın fizyolojik düzeylerde kolayca emilebilmesi, serbest radikalleri süpürebilmesi ve metallerle şelasyon yapabilmesi gerekir. Ayrıca sulu ortamlarda ve hücre membranında etkili olabilmesi ve olumlu yönde gen ekspresyonunu etkileyebilmesi gerekmektedir. Endojen antioksidanlar hücre fonksiyonları en yüksek düzeyde tutmakta ve sonuçta sağlıklı olmada önemli rol oynamaktadırlar. Oksidatif stresin arttığı durumlarda

endojen antioksidanlar yetersiz kalmakta, optimal hücresel fonksiyonların korunması için ise diyetle eksojen antioksidanlara ihtiyaç duyulabilmektedir. En etkili enzimatik antioksidanlar GSH, CAT ve superoksit dismutazdır (SOD). İndirgenmiş glutasyon, vitamin E ve vitamin C, melatonin, karotenoidler ve doğal flavonoidler ise enzimatik olmayan antioksidanlardır [44].

1.3. Melatonin

Omurgalı hayvanlarda hipofizden salgılanan melatonin hormonunun bugün birçok hücre ve doku tarafından da oluşturulduğu bilinmektedir. Ancak memelilerde kan melatonin düzeyleri hala yalnızca hipofizden üretilebilmektedir. Diğer organlardaki melatoninin lokal etkili bir otakoid, parakoid veya antioksidan olarak kullanıldığı görülmektedir [45,46]. Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) ilk olarak sığır hipofizinden izole elde edilmiştir [46,47]. Özellikle memelilerde bu maddenin oluşumu ve salınımı geceleri uyku sırasında artmakta ve kan düzeyleri yükselmektedir. Gece oluşabilen melatoninin N-asetil serotonin üzerine hidroksiindol-O-metiltransferaz etkisiyle oluştuğu kabul edilmekte ve bu enzimin melatonin sentezinde kontrol noktası olarak görev yaptığı bildirilmektedir [46,48].

Melatonin memelilerde hücre membranında yerleşen melatonin reseptörleri (MR1 ve MR2) aracılığıyla ve ikincil ulak olarak ise G proteinleriyle birleşerek etkilerini gösterir. Bu maddenin hücre membranlarını kolayca geçip hücrenin sitozol ve çekirdeğine de ulaşabildiği ve etkileyebildiğine dair bilgiler günümüzde bildirilmektedir. Bu bilgiler özellikle melatoninin antioksidan enzimlerle nasıl bir ilişki kurabildiklerini açıklamada önemli ipuçları verebilmektedir [46,49].

Melatoninin son yıllarda serbest radikal süpürücüsü bir madde olduğu [46,50] ve bu konuda oksidatif stresi önleyebildiğine dair çok sayıda araştırma yapılmıştır [46,51,52]. Oksidatif stresle mücadelesinde temel olarak serbest radikalleri doğrudan bir etkiyle süpürücü özelliği [46,53], antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırıcı [46,54,55] ve glutasyon gibi intrasellular antioksidan maddelerin sentezini uyarması [56], mitokondriyel elektron transfer zincirinden elektron sızıntısını azaltarak [57] ve diğer antioksidan maddelerle sinerjik etkilerinden kaynaklanmaktadır [58]. Üstelik melatoninin serbest radikalleri süpürdüğünde antioksidan özellikleri daha da açık bir şekilde gözükülebilmektedir [53].

Melatonin hücre membranında ve bazen de çekirdeğinde reseptörlere sahip olmalarına karşın serbest radikal süpürücülüğünü doğrudan bir etkiyle reseptörlere ihtiyaç duymadan gerçekleştirir. Çünkü melatonin tüm bariyerleri kolayca geçebilmekte ve hücrelere kolayca girebilmektedir. Oksijen ve nitrojen kaynaklı radikaller ile de mücadele edebilse de asıl olarak hidroksil radikalini süpürücü özelliği daha yaygındır [50]. Yapılan çalışmalar, melatoninin hidrojen peroksit, singlet oksijen, hipokloroz asit, süperoksit anyonu, nitrik oksit, peroksinitritler ve diğer birçok radikalleri süpürebildiğini ortaya koymaktadır [46].

Melatonin elektrondan zengin aromatik indol halkasına sahiptir ve elektron vericisi olarak fonksiyon görmesiyle elektrofilik radikallerle mücadele için önemli bir avantaj sağlamaktadır. Melatoninin redoks siklusuna uğramadığı ve antioksidan bir madde olduğu bildirilmektedir [46,59].

Melatonin mitokondriyel düzeylerdeki etkileriyle hücrelerin normal yaşamlarının iyi olmasını ve apoptozise uğramalarını önleyerek birçok olumlu etkiye sahiptir [46,57]. Böylece melatonin normal hücrelerde elektron transferini ve ATP üretimini artırarak elektron transport zincirini ve oksidatif fosforilasyonu etkiler. Özellikle apoptozise karşı hücreleri koruması bu maddenin antioksidan içeriğindeki indolaminlerin serbest radikal süpürücü aktivitesine bağlıdır [46,60]. İlginç olan ise tümör hücrelerinde melatoninin apoptozis ile hücre ölümlerini daha da artırabilmesidir [46,61].

Yukarıda sayılan doğrudan serbest radikal süpürücü özelliklerine ilaveten melatoninin başta GSH-Px, SOD ve CAT gibi antioksidan enzim aktivitelerini de uyararak oksidatif stresle mücadelede önemli görevler yaptığı bildirilmektedir. Bu enzim aktivitelerindeki artışları birçok türde ve çeşitli dokularda hem fizyolojik hem de farmakolojik dozlarda yapabildiği ortaya konulmuştur. Aynı şekilde intrasellular bir antioksidan olan GSH düzeyleri melatonin tarafından oksidatif streste normal tutulmaya çalışıldığı bildirilmesine [46,56] karşın etki mekanizması tam olarak aydınlatılmamıştır. Yine birçok prooksidan enzim aktivitesinde melatoninin negatif yönde bir etkisinden söz edilmekte ve özellikle NO sentaz olarak bilinen 5 ve 12 lipoksijenazlar melatonine bu anlamda iyi cevap verebilirler [46,62]. Melatonin reseptörü olarak düşünülen quinon redüktaz 2 [46,49] enzimine bağlanan melatonin prooksidan quinonların detoksifiye edilmesinde önemli görevler yaptığı bildirilmektedir. Ayrıca antioksidan özellikleri iyi bilinen vitamin C ve vitamin E ile kombine uygulandığında oksidatif strese karşı aralarında

sinerjik etkiler görülmekte [46,58], aynı dozlarda tek başlarına kullanıldığında ise bu vitaminlerden daha güçlü antioksidan özellikleri olduğu ileri sürülmektedir [46,63,64].

1.4. Amaç

Günümüzde endüstrinin gelişmesiyle birlikte birçok zehirli madde üretilmekte ve değişik şekillerde çevreye yayılmaktadır. Bunlardan dioksin ve benzeri maddeler özellikle zehirliliklerinin yüksek olması ve canlılarda çok önemli yalın ve özel zehirli etkilere sahip olmaları bakımından büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada dioksinler grubunun en toksik bileşiği olarak bilinen TCDD'nin sıçanlarda merkezi sinir sisteminin en önemli yapısı olan beyin üzerine muhtemel olumsuz etkilerinin belirlenmesi ve oluşacak toksisiteye karşı endojen bir hormon olan melatoninin dışarıdan yüksek dozlarda verilmesiyle bu toksik etkilere karşı muhtemel koruyucu etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. MATERYAL

2.1.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Spektrofotometre	Techcomp UV 7500
Spektrofotometre küveti (normal ve kuvarz)	
Soğutmalı santrifüj	Hettich Universal 320R
İnkübatör	Nüve FN ₅₀₀
Homojenizatör	B.BRAUN 853022
pH metre	WTW pH 340i
Vorteks	Velp Scientifica 10.0176
Su banyosu	Nüve NB9
Derin dondurucu (-20 °C)	Arçelik 2553 D
Hassas terazi (0,001g - 150g)	Denver instrument Apx-153
Bidistile su cihazı	GFL 2104
Manyetik karıştırıcı	Colara Magnetomix
Balon joje (5, 10, 25, 50 ml)	Isolab
Beher (25, 50, 100 ml)	Isolab
Cam tüp (16x100 mm)	Isolab
Erlen (25, 50, 100, 250 ml)	Isolab
Mikro pipet (10-100,100-1000 µl)	Thermo Labsystems
Mavi ve sarı pipet ucu	Isolab

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Araştırmada kullanılan TCDD AccuStandard[®] (Katalog No: D404S, USA); melatonin ise Merck (Darmstadt, Germany) firmasından satın alındı. Analizlerde kullanılan diğer sarf malzemeleri analitik düzeyde olup Sigma firmasından temin edildi.

2.1.3. Deneý Hayvanları

Araştırmada kullanılan deneý hayvanları Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Birimi'nden (FÜDAM) temin edildi. Ortalama ağırlıkları 230-250 g olan 6-8 haftalık 28 adet Sprague-Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. FÜDAM'da gerçekleştirilen çalışmalarda sıçanlar standart şartlarda (sabit ve ısı havalandırılmalđ odalarda; 12 saat g¼n ışığı ve 12 saat karanlık olmak üzere) bir kafeste en fazla 4 hayvan olacak şekilde kafeslerde barındırıldı. Sıçanlara taze su ve yem *ad libitum* olarak verildi. Sıçanların beslenmesinde Elazığ Yem Fabrikasından temin edilen 8 mm'lik rat pellet yemleri kullanıldı. Ratların beslenmesinde kullanılan yemin bileşimi Tablo 2'de g¼sterilmiřtir.

Deneý hayvanlarının seçimi ve yapılan uygulamalar sırasında Fırat Üniversitesi Hayvan Deneýleri Etik Kurulu (Toplantı tarihi 10.06.2009; Toplantı Sayısı: 22; Karar No: 42) onayı alınarak; çalışma standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yapıldı. Deneý s¼resi bir ay olarak belirlendi.

Ratların bir ay boyunca haftada bir canlı ağırlık tartımları yapılarak çalışma sonunda canlı ağırlık ortalamaları değerlendirildi. Ayrıca alışma periyodu boyunca ¼len hayvanların ¼l¼m g¼nleri de kaydedildi.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan ratlara verilen yemin besin madde bileşimi

Yem Bileşimi	Oran
Su (en çok)	% 12
Ham protein (en az)	% 24
Ham sel¼loz (en çok)	% 7
Ham k¼l (en çok)	% 8
HCL' de öz¼nmeyen k¼l (en çok)	% 2
NaCl (en çok)	% 1
Mineral Karması *	% 1.25
Vitamin Karması **	% 1.25
Metabolik enerji	2650 kcal/kg

* Mineral Karması: Kalsiyum (% 1.0 -2.8), Fosfor (% 0.9), Sodyum (% 0.5-0.7), Mangan (10 mg/kg), çinko (4 mg/kg).

** Vitamin Karması: Vitamin A (300 i¼/kg), Vitamin D₃ (1000 i¼/kg), Vitamin E (60 mg/kg), Vitamin B2 (4 mg/kg).

2.1.3.1. Deney Grupları

Her grupta 7 hayvan olacak şekilde ratlar 4 gruba ayrıldı;

- 1. Grup (Kontrol):** 30 gün boyunca hayvanlara günlük olarak 0,5 ml mısır yağı gavajla uygulandı. Melatonin uygulamasıyla orantılı olarak 0,5 cc sıvı (9 kısım fizyolojik serum + 1 kısım etil alkol) periton içi verildi.
- 2. Grup (Melatonin):** 30 gün boyunca hayvanlara günlük olarak 5 mg/kg dozunda melatonin (200 mg melatonin 10 ml etil alkolde çözülüp fizyolojik serumla 9/1 oranında seyreltildi) periton içi verildi.
- 3. Grup (TCDD):** 30 gün boyunca günlük olarak 0,5 ml mısır yağı içerisinde 500 ng/kg dozunda TCDD gavajla uygulandı.
- 4. Grup (TCDD+Melatonin):** 30 gün boyunca günlük olarak 0,5 ml mısır yağı içerisinde 500 ng/kg dozunda TCDD gavajla eş zamanlı 5 mg/kg dozunda melatonin periton içi verildi.

Çalışmada kullanılan TCDD'nin dozu Hassoun ve ark., [65] melatoninin dozu ise Ateşşahin ve ark., [66] ile Jayanthi ve ark., [67] tarafından önerilen dozlardan seçilmiştir.

2.1.4. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması

Son ilaç uygulamasından 24 saat sonra ratlar hafif bir eter anestezisine alınarak dekapite edildi. Kafatasları uygun bir makasla açıldıktan sonra tüm beyin dokuları alındı. Alınan beyin dokusu tam iki eşit kısma ayrıldı. İlk kısımdaki örnekler biyokimyasal analizler için (malondialdehit ve GSH düzeyleri ile katalaz aktivitesi) -20 °C'de muhafaza edildi. Geri kalan ikinci kısım ise başka amaçlar için saklandı.

2.1.4.1. Homojenatların Hazırlanması

Derin dondurucudan alınan dokular tartılıp cam tüplere konuldu. Üzerlerine 1/10 (g/v) oranında dilüsyon olacak şekilde %1,15' lik potasyum klorür (KCl) ilave edildikten sonra soğuklukları muhafaza edilerek cam-teflon homojenizatörde 16.000 devir/dk hızda 3 dk homojenize edildi. Hazırlanan homojenatlarda doku MDA tayinleri yapıldı.

Geri kalan homojenat +4 °C'de 45 dakika süreyle 3500 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Bu süpernatantlarda ise redükte GSH, CAT aktivitesi ile protein ölçümleri yapıldı.

2.2. Metot

2.2.1. Beyin Dokusu MDA Düzeylerinin Ölçümü

Beyin dokusu MDA düzeylerinin tayini spektrofotometrik olarak Ohkawa ve ark. [68] tarafından önerilen metoda göre yapıldı.

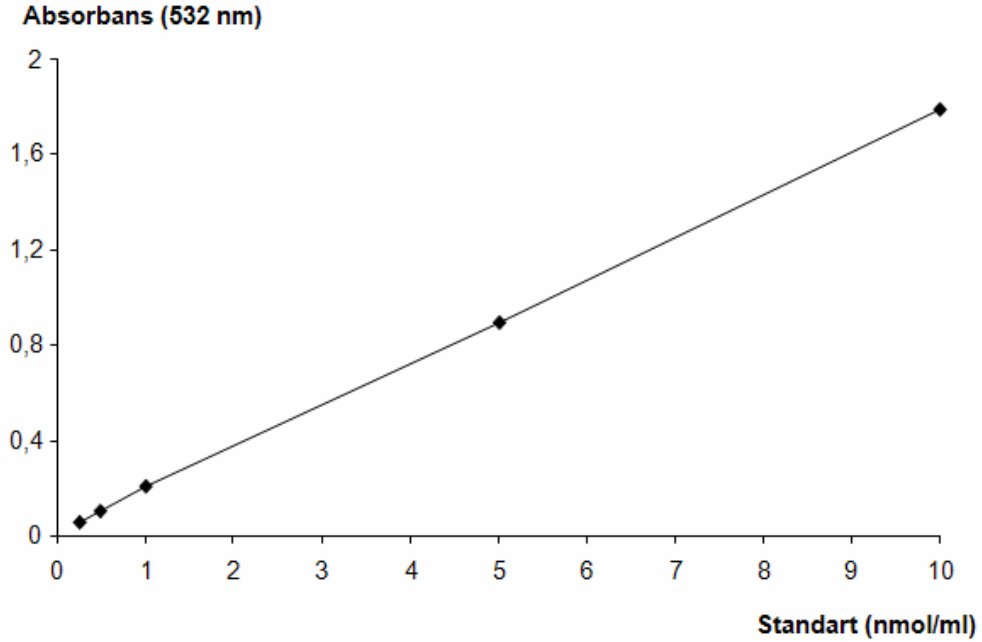
Prensip: Aerobik şartlar altında ve pH 3,5'te, doku homojenatının kaynar su banyosunda bir saat inkübasyonu sonucu, lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu pembe renkli kompleksin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanır.

Ayırıcılar

- 1- Tiyobarbitürik asit (TBA) ayırıcı: 0,25 N HCl içerisinde %0,65 TBA çözdürüldü.
- 2- Trikloroasetik asit (TCA) ayırıcı: 0,25 N HCl içerisinde %10 TCA çözdürüldü.
- 3- Standart (1,1,3,3 tetraetoksipropan): %50 Etanol içerisinde hazırlandı.

Stok standarttan konsantrasyonu 20 nmol/ml olan günlük stok hazırlandı. Bu standarttan belli oranlarda dilüsyonlar yapılarak 0.25, 0.5, 1, 5, 10 nmol/ml konsantrasyonlarda çalışma standartları hazırlandı. Çalışma standartlarından 0,5 ml TCA ve TBA ayırıcılarından 1'er ml alınarak kalibrasyon eğrisi hazırlandı (Şekil 2).

Tüpler karıştırıldıktan sonra 95 C°'de 30 dk kaynar su banyosunda tutuldu ve soğutuldu. 3500 rpm'de 10 dk santrifüj edilip üst kısımları pipetlendi. 532 nm'de köre karşı okunup standartlardan eğri çizimi yapıldı. Daha sonra çalışılan tüm örnekler için bu eğri kullanılarak MDA düzeyleri belirlendi. Ölçülen beyin dokusu MDA düzeyleri nmol/ml olarak ifade edildi.



Şekil 2. MDA kalibrasyon eğrisi

Yöntem

Örnekler için ayıraçlar tüplere standart eğri oluşturulurken uygulanan şekilde (0,5 ml homojenat, 1 ml TBA, 1 ml TCA) hazırlandı ve aynı uygulamalara tabi tutuldu. Spektrofotometrede 532 nm’de absorbanslar belirlendi ve kalibrasyon eğrisi yardımıyla MDA düzeyleri nmol/ml homojenat olarak hesaplandı.

Hesaplama

532 nm’de okunan örnek absorbansları (OD) standart değerleri kullanılarak aşağıdaki formül yardımıyla değerlendirildi:

$$\text{MDA (nmol/ml)} = (\text{Örnek absorbansı} / \text{Std. absorbansı}) \times \text{Std. Konsantrasyonu}$$

2.2.2. Beyin Dokusu Redükte GSH Düzeylerinin Ölçümü

Beyin dokularındaki redükte GSH düzeyleri Ellman [69] tarafından önerilen ditiyonitrobenzoik asit geri çevirim metodu olarak tanımlanan yöntemle göre tayin edildi.

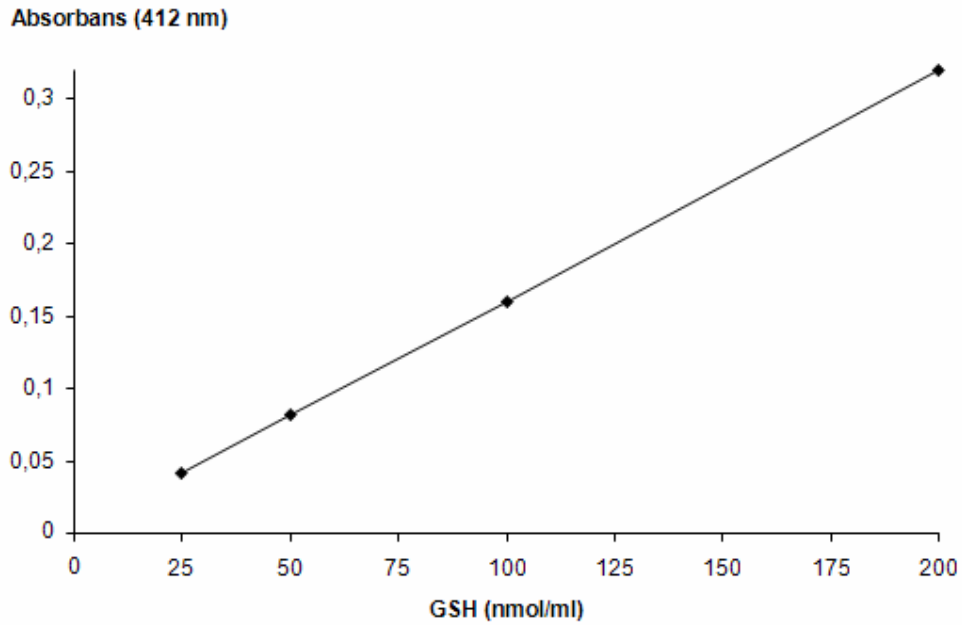
Prensip: 5,5’-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit (DTNB), sülfüdril bileşikler tarafından redükte edilerek bir disülfid bileşiği olan sarı renkli kompleks oluşturulur. Daha sonra bu

sarı renkli bileşimin optik dansitesi 412 nm dalga boyunda ölçülerek GSH düzeyleri saptanır.

Ayırıcılar

1. Tris EDTA Tamponu (0,2 mol/ml, pH: 8,9)
2. TCA Ayırıcı (% 10'luk)
3. DTNB (5-5'-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit) (0,01 mol/L)

Konsantrasyonu 1000 nmol/ml olan stok standart hazırlandı. Bu stok standarttan belli oranlarda dilüsyonlar yapılarak 25, 50, 100, 200 nmol konsantrasyonlarda çalışma standartları hazırlandı. Çalışma çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon eğrisi Şekil 3 'de gösterilmiştir.



Şekil 3. Redükte GSH kalibrasyon eğrisi

Yöntem

Homojenat +4 °C'de 45 dakika süreyle 3500 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. 0,5 ml süpernatant ile 0,5 ml TCA ile çöktürüldü ve tekrar 3500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üstteki kısımdan 0,5 ml alınıp 2 ml Tris EDTA tamponu

ilave edildi. Daha sonra 0,1 ml DTNB ilave edilerek karıştırıldı. 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 412 nm'deki absorbansları köre karşı okunarak belirlendi. Elde edilen değerler $\mu\text{mol/g}$ protein olarak sunuldu.

2.2.3. Beyin Dokusu CAT Aktivitesi Ölçümü

CAT enzim aktivitesi Aebi [70] tarafından tarif edilen metoda göre yapıldı. CAT katalitik aktivitesiyle hidrojen peroksit (H_2O_2)'i parçalayarak su ve oksijene dönüştürmektedir.

Prensip: Hidrojen peroksit, 240 nm dalga boyunda maksimum absorbans göstermektedir. Deney ortamına ilave edilecek H_2O_2 'nin CAT enzimi tarafından parçalanması, UV spektrumunda bir absorbans azalması olarak takip edildi. Absorbanstaki azalma enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır.

Ayırıcılar

1. Fosfat Tamponu (pH: 7; 50 mM)
2. H_2O_2 çözeltisi (% 30)

Yöntem

Spektrofotometre 240 nm'de fosfat tamponuna karşı sıfırlanır. Fosfat tamponuna % 30'luk H_2O_2 ilave edilerek absorbans 0,50 oluncaya kadar azar azar ilave edilir.

Numune ilavesi ile 240 nm dalga boyundaki absorbans azalması her 30 saniyede bir 2 dakika boyunca kaydedildi. Hesaplama 1 dakikalık lineer absorbans azalmasının değerleri esas alındı.

Hesaplama

$$k/dk = k \times dk^{-1} = (2.31 \times \log \text{Okunan Değer 1} / \text{Okunan Değer 2}) / 30 \text{ sn}$$

2.2.4. Protein Ölçümü

Süpernatantlardaki protein miktarı tayini ise yine bu süpernatantlarda Lowry ve ark [71] tarafından tarif edilen yöntemle göre tayin edildi.

Prensip: Alkali bakır ayırıcındaki Cu^{++} peptid bağları ile kompleks yapmaktadır. Her 7 veya 8 aminoasit artığı 1 atom bakır bağlamaktadır. Folin-Fenol ayıracı, bakır ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde oluşan mor-mavi renk 650 nm’de okunur.

Ayıraçlar

1. Alkali bakır ayıracı
2. Fenol ayıracı
3. Bovine serum albumin (150 μ /ml)

Yöntem

1/100 oranında sulandırılan doku örneğinden ve alkali bakır ayırıcından 1’er ml alınarak karıştırılır, oda ısısında 10 dk bekletilir. 4 ml fenol ayıracı ilave edildikten sonra kaynar su banyosunda 55 °C’de 5 dk bekletilir. İnkübasyon sonucunda hemen soğutularak absorbansları 650 nm’de köre karşı okunur.

2.2.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmadan elde edilen veriler ‘‘SPSS for Windows 11.5’’ paket programı kullanılarak değerlendirildi. Normallik testleri yapıldı ve veriler nonparametrik test varsayımlarına uyduğu için grupların karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi ve ardından gruplar arası karşılaştırmalar için Tukey HSD testlerine tabi tutuldu. Canlı ağırlıklardaki değişimler ise nonparametrik testlerden Wilcoxon testine tabi tutuldu. Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi ve $p<0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Canlı Ağırlık ve Makroskopik Bulgular

Çalışmaya alınan sıçanlara ait başlangıç ve bitiş canlı ağırlık değişimleri Tablo 3'te gösterilmiştir. Araştırmada kullanılan sıçanların başlangıç ağırlıkları homojen olarak oluşturulmuş ve ortalama 230-250 g aralığında olan hayvanlar kullanılmıştır. Kontrol, melatonin ve TCDD grubu ratlarda başlangıç ağırlıkları ile deneylerin sonunda ölçülen ağırlıklar arasında istatistikî olarak bir artış ($p<0,05$) olmasına karşılık TCDD+Melatonin grubunda ise deneylere başlanan ağırlıklarda herhangi bir değişiklik meydana gelmemiştir. Çalışma süresince kontrol grubu ve TCDD+Melatonin gruplarında 1'er hayvan sırasıyla 14 ve 15'nci günlerinde ölmüşlerdir. Geri kalan hayvanlar çalışmanın bitimine kadar sağlıklı bir şekilde yaşamalarını sürdürmüş ve dekapite edilmişlerdir. Laparotomi yapılarak açılan iç organlarında ve kafatası açılan hayvanların beyin dokularında herhangi bir makroskopik patolojik duruma tüm gruplarda rastlanılmamıştır.

Tablo 3. Araştırmaya alınan ratların canlı ağırlıkları.

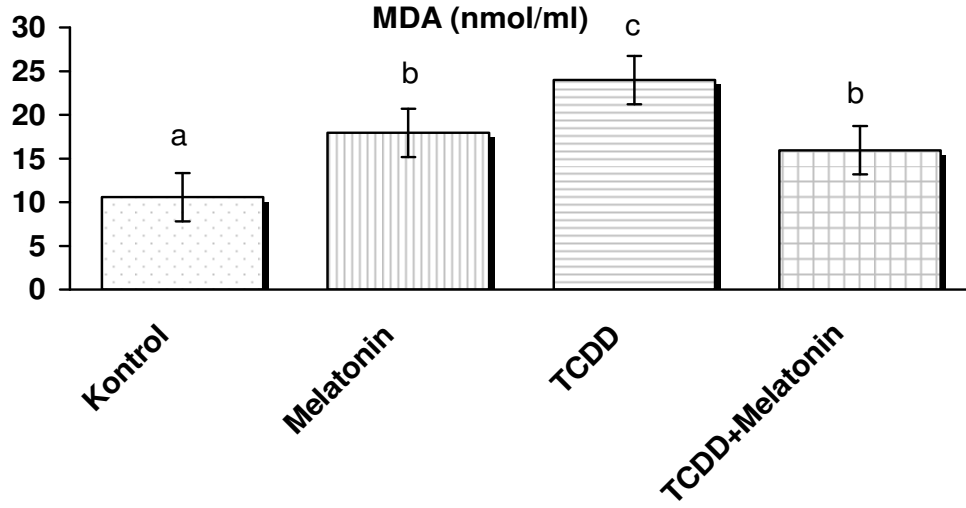
Gruplar	Başlangıç canlı ağırlığı (0. gün)	Bitiş canlı ağırlığı (30. gün)	P değeri
Kontrol	239,8±9,86	279,3±8,31	0,028
Melatonin	229,4±15,19	268,2±11,05	0,018
TCDD	234,1±12,00	260,0±16,08	0,028
TCDD+Melatonin	253,0±17,72	247,1±29,11	0,917

3.2. Biyokimyasal Parametreler

3.2.1. Beyin Dokusu MDA Düzeyleri

Beyin dokusu MDA düzeyleri Şekil 4'te sunulmuştur. Kontrol grubu MDA düzeylerinin $10,58±0,61$ nmol/ml homojen olarak belirlendiği buna karşılık tek başına TCDD verilen grupta ise bu düzeylerin anlamlı bir şekilde artarak $23,97±1,44$ nmol/ml seviyelerine çıktığı görülmüştür. Aynı şekilde tek başına melatonin verilen grupta ise $17,93±0,48$ nmol/ml değeriyle kontrol grubuna göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. Tek

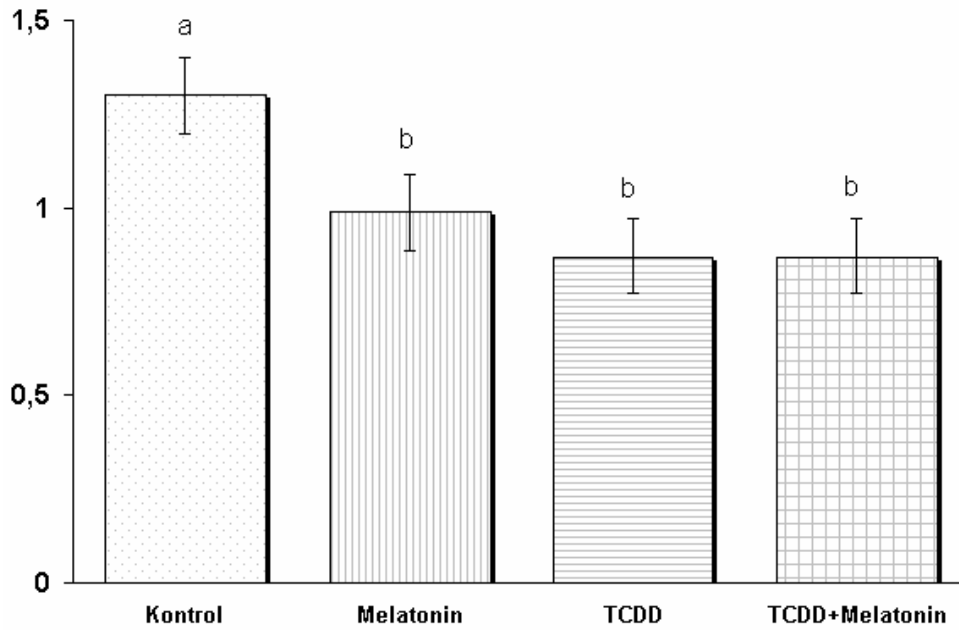
başına TCDD verilen grupla karşılaştırıldığında TCDD+Melatonin grubunda MDA düzeylerinin anlamlı bir şekilde ($p<0,001$) azaldığı ve $15,95\pm0,87$ nmol/ml değerlerinde olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4. Gruplara ait beyin dokusu MDA düzeyleri ($p<0,05$).

3.2.2. Beyin Dokusu Redükte GSH Düzeyleri

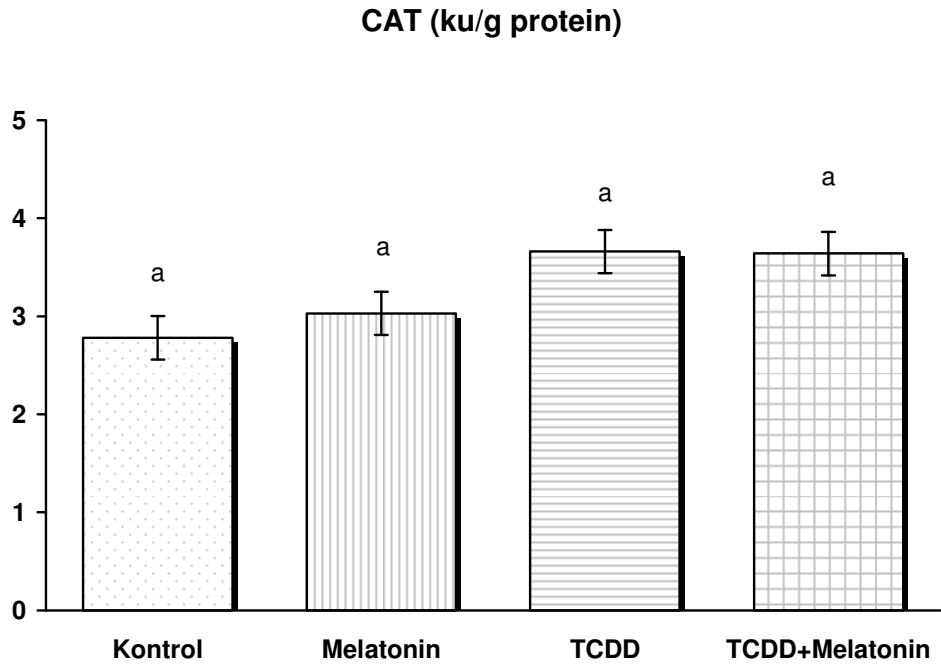
Beyin dokusu redükte GSH düzeyleri Şekil 5'te sunulmuştur. Çalışmaya alınan hayvanlardan kontrol grubu ratlarda GSH düzeylerinin $1,30\pm0,22$ nmol/g protein olduğu buna karşılık tek başına TCDD verilen grupta ise $0,87\pm0,04$ nmol/g protein düzeylerine indiği belirlenmiştir. Tek başına TCDD verilen grupla karşılaştırıldığında TCDD+Melatonin verilen grupta $0,87\pm0,06$ nmol/g protein aynı değerler tespit edilmiştir. Tek başına melatonin verilen hayvanlarda beyin dokusu GSH düzeylerinin ise $0,99\pm0,08$ nmol/g protein olarak tespit edilmiştir.



Şekil 5. Gruplara ait beyin dokusu redükte GSH düzeyleri ($p < 0.05$).

3.2.3. Beyin Dokusu CAT Aktiviteleri

Araştırmaya alınan hayvanların beyin dokusu CAT aktivitelerine ait sonuçlar Şekil 6'da sunulmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tek başına TCDD verilen grup arasında bir artış (sırasıyla $2,78 \pm 0,87$ ve $3,66 \pm 1,32$ ku/g protein) olduğu ancak bunun anlamlı olmadığı ($p > 0,05$) belirlenmiştir. Aynı şekilde melatonin ve TCDD+Melatonin gruplarında da kontrol grubuna göre herhangi bir farklılığın olmadığı ($p > 0,05$) tespit edilmiştir.



Şekil 6. Gruplara ait beyin dokusu CAT aktiviteleri ($p > 0.05$).

4. TARTIŞMA

Çevresel bir kirletici ve canlılar için toksisitesi iyi bilinen TCDD'nin merkezi sinir sistemi üzerine olan olumsuz etkileri iyi bir şekilde bilinmektedir. Bu madde ile başta kemiriciler olmak üzere birçok hayvan türünde toksisite çalışmaları yapılmış ve özellikle sinir sistemi [32,72,73], üreme organları [74,75], endokrin sistem [76] ve diğer birçok sistemde belirgin zehirli etkiler meydana getirdiği bildirilmektedir. Ratlarda yapılan çalışmalarda TCDD'nin subakut ve kronik toksik etkilerini 46 ng/kg dozlarında gösterdiği bildirilmektedir [32]. Kronik çalışmalarda genellikle bu dozdan daha yüksek düzeylerde TCDD verilerek belirgin hasarlar oluşturulmuştur [77]. Bu çalışmada TCDD'nin dozu beyinde belirgin bir oksidatif stres oluşturmak amacıyla 500 ng/kg gibi yüksek bir doz olarak belirlenmiş ve 30 gün süreyle subakut bir toksisite oluşturulmaya çalışılmıştır.

TCDD ve benzeri bileşiklerin canlılarda yem tüketimini ciddi bir şekilde azalttığı ve sonuçta canlı ağırlık kazancında azalmalara neden olduğu ileri sürülmektedir [78]. Hassoun ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada 46 ng/kg TCDD uygulanan ratlarda canlı ağırlık artışlarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak bir değişiklik göstermediğini bildirmişlerdir [32]. Tarafımızdan yapılan bu çalışmada, Tablo 3 incelendiğinde tek başına TCDD verilen gruba kontrol grubu arasında canlı ağırlık bakımından bir fark olduğu ancak bunun anlamlı olmadığı; buna karşın TCDD+Melatonin verilen grupta ise canlı ağırlıkların başlangıç ile araştırmanın sonu arasında hiçbir farklılığın olmadığı görülmektedir. Yukarıdaki araştırmalara paralel olarak araştırmaya alınan hayvanlarda canlı ağırlıklarının yem tüketimi üzerine muhtemel olumsuz etkilerinden dolayı azalabileceği kanaatine varılmıştır.

TCDD ve benzeri bileşiklerle olan zehirlenmelerde oksidatif stresle ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır [32,72,74]. Laboratuvar hayvanlarına tek doz veya tekrarlanarak uygulanan dioksin benzeri bileşiklerin reaktif oksijenlerin üretimini artırdığı, DNA hasarları oluşturduğu ve hücrede membran akıcılığında azalmalar gösterilmiştir [32,72]. Oksidatif stresin indüklendiği ratlarda yapılan çalışmalarda özellikle beyin ve karaciğerde süperoksit anyon üretiminde, lipid peroksidasyonunda ve DNA tek zincir kırılmalarında önemli artışlar gösterilmiştir [65].

Beyinde TCDD'nin serbest radikal oluşturma gücü aynı şekilde bu stres faktörleriyle ilişkili olan antioksidan enzimlerin de etkilenmelerine ve dolayısıyla singlet oksijen,

süperoksit anyonu ve hidroksil anyonlarının oluşumlarının farklı olmalarına yol açabilmektedir [32,72].

Lipit peroksidasyonun en önemli göstergelerinden olan malondialdehit düzeylerinin özellikle serebral korteks ve hipokampusta TCDD tarafından önemli düzeylerde artırıldığı ve beynin diğer bölgelerinin ise fazla etkilenmediği belirtilmiştir [33]. Bu çalışmada 500 ng/kg dozda TCDD'nin 30 gün süreyle uygulanması, tüm beyin dokusunda önemli derecede MDA düzeylerinde artışlara neden olmuştur. Yukarıdaki araştırmacıların görüşlerine paralel olarak TCDD uygulamalarının hücre membranlarında serbest radikal oluşumunu artırarak, MDA düzeylerinde artışlara yol açmakta ve sonuçta lipit peroksidasyonuna neden olmaktadır.

GSH memelilerin antioksidan biyolojisinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Dokularda GSH düzeylerinin azalması birçok patolojik olayın varlığına işaret etmektedir [79,80]. Ayrıca vitamin C ve tokoferol gibi diğer antioksidan sistemlerin yenilenmesi üzerine olan etkilerinden dolayı bu antioksidanların durumunu da etkileyebilmektedir [80,81]. GSH düzeylerinin ksenobiyotiklere karşı verdiği tepki bazen azalarak bazen de yükselerek kendini gösterebilmektedir. Özellikle çok düşük miktarlarda toksik ajanlara maruz kalınan durumlarda, GSH oluşumunun arttığı, ancak yüksek dozlardaki ajanlara karşı ise tükenmeye bağlı olarak miktarlarında azalmalar görüldüğü bildirilmektedir [80]. Bu çalışmada TCDD'nin yüksek dozlarda uygulanmasına bağlı olarak GSH düzeylerinin glutatyon peroksidaz üzerindeki inhibisyonuna ve muhtemelen tükenmeye bağlı olarak anlamlı bir şekilde azaldığı görülmektedir (Şekil 5).

Aerobik hücrelerin peroksizomlarında bulunan ve hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene dönüştüren CAT, enzimatik antioksidan sisteminin önemli bir parçası olarak kabul edilmektedir. Antioksidan enzimler içerisinde en yüksek dönüştürme gücüne sahip bir enzim olup bir molekül CAT 1 dakikada yaklaşık 6 milyon molekül hidrojen peroksidi su ve oksijene dönüştürebilmektedir [37]. Ksenobiyotikler diğer antioksidan enzimler üzerine olduğu gibi katalaz aktivitesini de inhibe etmektedirler. Özellikle karaciğer [82], testis [74,75] akciğer [83] gibi organlarda CAT aktiviteleri çok yüksek düzeyde aktivite gösterirken, beyin dokusunda bu enzimin aktivitesi oldukça düşük düzeydedir. Bu çalışmada TCDD kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında zaten düşük olan beyin dokusu CAT aktivitesi üzerine herhangi bir farklılık göstermemiştir.

Antioksidan savunma sistemi genel olarak enzimatik antioksidan enzimler ve doğrudan serbest radikal süpürücü küçük molekül ağırlıklı moleküller olarak

sınıflandırılabilir. Toksik maddelere karşı ilk olarak antioksidan enzimler savunma oluştururlar [84,85]. Antioksidan enzimlerin aktivasyonu antioksidan enzim mRNA sentezinin neticesiyle başlar, sonuçta enzim uyarılır. Melatoninin dolaylı antioksidan etkileri bu maddeye spesifik reseptörleri ile oluşabilmektedir. Hücrede hem membranlarda (MT1 ve MT2) hem de çekirdekte melatoninin reseptörleri belirlenmiştir [85,86]. Asıl antioksidan enzimler SOD, CAT, GSH-Px, GRd ve glutatyon-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD)'dir. Melatonin MT1ve MT2 reseptörlerinin aktivasyonuyla önce inhibitör G proteini vasıtasıyla fosfolipaz C yolağını uyarır. Sonuçta protein kinazın fosforilasyonu kalsiyum yoğunluğunda artış görülür ve nihayetinde sAMP cevabında artışlar görülür. Bu yolaklarla gen transkripsiyonu düzenlenir ve antioksidan özellikler oluşabilmektedir. Hücrede ROS üretimindeki artışlar yangıya neden olacak şekilde genlerin salınımına neden olurlar. Sonuçta melatoninin doğrudan serbest radikal kovucusu, dolaylı antioksidan etkileri ve antiinflamator etkileriyle toksik maddelere karşı faydalı etkileri oluşabilmektedir [85,86].

Bu çalışmada TCDD tarafından beyin dokusunda oluşturulan MDA düzeylerindeki artışlar melatonin tarafından azaltılarak iyileştirilmiş ve azalan GSH düzeyleri de buna karşılık yükseltilmiştir. Bu sonuçlar daha önceki bulgulara paralellik göstermekte ve melatoninin serbest radikal süpürücü özellikleri ve antioksidan gücüyle açıklanabilir.

5. SONUÇ

Sonuç olarak, TCDD verilen hayvanların canlı ağırlık artışlarının azaldığı ve bunun muhtemelen yem tüketimindeki azalmalarla oluştuğu, lipid peroksidasyona neden olan MDA düzeylerinin arttığı, GSH düzeylerinin azaldığı ve CAT aktivitelerinin ise etkilenmediği, buna karşın melatonin verilen gruplarda ise özellikle MDA ve GSH düzeyleri açısından olumlu sonuçlar alındığı ve melatoninin iyi bir antioksidan özellik gösterdiği görülmüştür.

6. KAYNAKLAR

- [1] **White, S.S. and Birnbaum, L.S.**, 2009. An overview of the effects of dioxins and dioxin-like compounds on vertebrates, as documented in human and ecological epidemiology, *J. Environ. Sci. and Heal. C.*, **27**, 197-211.
- [2] **Bertazzi, P. and Di Domenico, A.**, 2003. Health cosequenses of the Seveso, Italy, accident. In: Schecter, A. Gasiewicz, T. A. (Eds.), *Dioxins and Health*. Wiley, Hoboken, NJ, 827-854.
- [3] **Schecter, A., Birnbaum, L., Ryan J.J. and Constable, J.D.**, 2006. Dioxins: An overview, *Environ. Res.*, **101**, 419-428.
- [4] **Masuda, Y.**, 2003. The Yusho rice oil poisoning incedent. In: Schecter, A. Gasiewicz, T.A. (Eds), *Dioxins and Healthy*. Wiley, Hoboken, NJ, 885-892.
- [5] **Rogan, W.J., Gladen, B.C., Hung, K.L., Koong, S.L., Shih, Y.L., Taylor, J.S., Wu, Y.C., Yang, D., Rogan, N.B. and Hsu, C.C.**, 1988. Congenital poisoning by polychlorinated biphenlys and their contaminants in Taiwan, *Science*, **241**, 334-336.
- [6] **Guo, Y.L. and Yu, M.L.** 2003. The Yucheng rice oil poisoning incident. In: Schecter, Gasiewicz, T.A. (Eds), *Dioxins and Healthy*. Wiley, Hoboken, NJ, 893-920.
- [7] British Broadcasting Corp. (BBC), 2004. Deadly dioxin used on Yushchenko. Retrieved February 14, 2005, from <http://news.-bbc.co.uk/1/hi/world/europe/4105035.stm>.
- [8] **Safe, S.H.**, 1998. Development validation and problems with the toxic equivalency factor approach for risk assesment of dioxins and related compounds, *J. Anim. Sci.*, **76**, 134-141.
- [9] **Landers, J.P. and Bunce, N.J.**, 1991. The Ah receptor and mechanism of dioxin toxicity, *Biochem. J.*, **276**, 273-287.
- [10] **Leung, H.W., Poland, A., Paustenbach, D.J., Murray, F.J. and Andersen, M.E.**, 1990. Pharmacokinetics of [125I]-2-iodo-3,7,8-trichlorodibenzo-p-dioxin in mice: analysis with a physiological modeling approach, *Toxicol. Appl. Pathol.*, **103**, 411-419.

- [11] **Poland, A. and Knutson, J.C.**, 1982. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **22**, 517-524.
- [12] **Safe, S.**, 1986. Comparative toxicology and mechanism of action of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **26**, 371-399.
- [13] **Stahl, B.U. and Rozman, K.**, 1990. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)-induced appetite suppression in the Sprague-Dawley rat is not a direct effect on feed intake regulation in the brain, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **106**, 158-162.
- [14] **Poland, A. and Glover, E.**, 1979. An estimate of the maximum in vivo covalent binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to rat liver protein, ribosomal RNA, and DNA, *Cancer Res.*, **39**, 3341-3344.
- [15] **Roberts, L.**, 1991. Dioxin risks revisited, *Science*, 251, 624-626.
- [16] **Cook, J.C., Dold, K.M. and Greenlee, W.F.**, 1987. An in vitro model for studying the toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to human thymus, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 89, 256-268.
- [17] **Carlsstedt-Duke, J.M.B.**, 1979. Tissue distribution of the receptor for 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the rat, *Cancer Res.*, 39, 3172-3176.
- [18] **Gasiewicz, T.A. and Bauman, P.A.**, 1987. Heterogeneity of the rat hepatic Ah receptor and evidence for transformation in vitro and in vivo, *J. Biol. Chem.*, **262**, 2116-2120.
- [19] **Israel, D.I. and Whitlock, J.P. Jr.**, 1985. Superinduction of cytochrome P1-450 gene transcription by inhibition of protein synthesis in wild type and variant mouse hepatoma cells, *J. Biol. Chem.*, **260**, 5648-5653.
- [20] **Jones, P.B.C. Galeazzi, D.R. Fisher, J.M. and Whitlock, J.P.Jr.**, 1985. Control of cytochrome P1-450 gene expression by dioxin, *Science*, **227**, 1499-1502.
- [21] **Kawajiri, K., Watanabe, J., Gotoh, O. Tagashira, Y., Sogawa, K. and Fujii-Kuriyama, Y.**, 1986. Structure and drug inducibility of the human cytochrome P-450c gene, *Eur. J. Biochem.*, **159**, 219-225.
- [22] **Patko, I., Juvancz, Z. and Turi M.S.**, 2007. Production of dioxins with special regard to furnaces using renewable energy. *8th International Symposium of Hungarian Researchers on Computational Intelligence and Informatics*. Budapest, Hungary.

- [23] **Mannear, J.H. and Lee, C.C.**, 1994. Polybrominated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans: Literature review and health assessment, *Environ. Health Persp.*, **102**(1), 265-274.
- [24] **Larsen, J.C.**, 2006. Risk assessment of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and dioxin-like polychlorinated biphenyls in food, *Mol. Nutr. Food Res.*, **50**, 885-896.
- [25] IARC., International Agency for Research on Cancer, Polychlorinated dibenzo-*para*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 69, Lyon, France, 1997.
- [26] **Diliberto, J.J. Kedderis, L.B. and Birnbaum, L.S.**, 1990. Absorption of 2,3,7,8 tetrabromodibenzodioxin (TBDD) in male rats, *Toxicologist*, **10**, 54.
- [27] **Diliberto, J.J. Jackson, J.A. and Birnbaum, L.S.**, 1991. Acute pulmonary absorption of 2,3,7,8-TBDD in rats, *Toxicologist*, **11**, 272.
- [28] **Jackson, J.A., Diliberto, J.J., Kedderis, L.B. and Birnbaum, L.S.**, 1991. Dermal absorption and disposition of 2,3,7,8-TBDD in rats, *Toxicologist*, **11**, 270.
- [29] **Kedderis, L.B. Diliberto, J.J. and Birnbaum, L.S.**, 1991. Disposition and excretion of intravenous 2,3,7,8-TBDD in rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **108**, 397- 406.
- [30] SCF., The EC Scientific Committee for Food, Opinion of the Scientific Committee on Food (SCF) on the risk assessment of dioxin and dioxin-like PCBs in food. Adopted on 22 November 2000.
http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out78_en.pdf.
- [31] USEPA, United States Environmental Protection Agency, Polychlorinated Dibenzo-*p*-dioxins and Related Compounds Update: Impact on Fish Advisories, 1999.
- [32] **Hossoun, A.E., Vodhanel, J. and Abushaban, A.**, 2004. The modulatory effects of ellagic acid and vitamin E succinate on TCDD-induced oxidative stress in different brain regions of rats after subchronic exposure, *J. Biochem. Mol. Toxic.*, **18**, 4.
- [33] **Dean, J.H., Murray, M.J. and Ward, E.C.**, 1986. Toxic responses of the immune system. In: Toxicology: The Basic Science of Poisons, 3rd ed C. D.Klassen, M.O. Amdur, M.O. and Doull, Eds.) Macmillan Publishing Co., New York, 245-285.

- [34] **Exon, J.H., Kerkvliet, N.T. and Talcott, P.A.**, 1987. Immunotoxicity of carcinogenic pesticides and related chemicals, *Environ. Carcinog. Rev.*, **C5(1)**, 73-120 .
- [35] **Ishida, T., Hori, M., Ishii, Y., Oguri, K. and Yamada, H.**, 2005. Effects of dioxins on stress responsive systems and their relevance to toxicity, *J. Dermatol. Sci.*, **1**, 105-112.
- [36] **Riley, P.A.**, 1994. Free radicals in biology: oxidative stress and effects of ionizing radiation, *Int. J. Rad. Biol.*, **65**, 27-33.
- [37] **Rahman, K.**, 2007. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors, *Clin. Intervent in Aging*, **2**, 219-236.
- [38] **Canadas, E.**, 1989. Biochemistry of oxygen toxicity, *Ann. Rev. Biochem.*, **58**, 79-110.
- [39] **Halliwell, B.**, 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life, *Plant Physiology*, **141**, 312-322.
- [40] **Lopaczynski, W. and Zeisel, S.H.**, 2001. Antioxidants, programmed cell death, and cancer, *Nutr. Res.*, **21**, 295-307.
- [41] **Glade, M.J.**, 2003. The role of reactive oxygen species in Health and Disease Northeast Regional Environmental Public Health Center University of Massachusetts, *Amerst Nutr.*, **19**, 401-403.
- [42] **Poli, G., Leonarduzzi, G., Biasi, F. and Chiarpotto, E.**, 2004. Oxidative stress and cell signaling, *Curr. Med. Chem.*, **11**, 1163-1182.
- [43] **Halliwell, B.**, 1996. Antioxidants in human health and disease, *Ann. Rev. Nutr.*, **16**, 33-54.
- [44] **Rahman, K.**, 2003. Garlic and aging: new insights into an old remedy, *Ageing Res. Rev.* **2**, 39-56.
- [45] **Tan, D.X., Manchester, L.C., Hardeland, R., Lopez-Burillo, S., Mayo, J.C., Sainz, R.M. and Reiter, R.J.**, 2003. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocrine, a paracrine and an antioxidant vitamin, *J. Pineal Res.*, **34**, 75-78.
- [46] **Reiter, R.J., Tan, D.X., Terron, M.P., Flores, L.J. and Czarnocki, Z.**, 2007. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions, *Acta Biochim. Pol.*, **54**, 1-9.
- [47] **Lerner, A.B., Case J.D. and Heinzelmann, R.V.**, 1959. Structure of melatonin, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 6084- 6085.

- [48] **Reiter, R.J.**, 1991. Melatonin: The chemical expression of darkness, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **79**, 153-158.
- [49] **Nosjean, O., Nicolas, J.P., Klupsch, F., Delagrangé, P., Canet, E. and Boutin, J.A.**, 2001. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 ve MT3-QR2: tissue distribution of MT3/QR2, *Biochem. Pharmacol.*, **61**, 1369-1379.
- [50] **Tan, D.X., Chen, L.D., Poeggeler, B., Manchester, L.C. and Reiter, R.J.**, 1993. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger, *Endocr. J.*, **1**, 57-60.
- [51] **Reiter, R.J.**, 2000. Melatonin: lowering the high price of free radicals, *News Physiol. Sci.*, **15**, 246-250.
- [52] **Hardeland, R. and Pandi, P.S.R.**, 2005. Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: actions as a natural food contaminant, gastrointestinal factor, drug and prodrug, *Nutr. Metab.*, **2**, 22-31.
- [53] **Reiter, R.J., Tan, D.X., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Leon, J. and Czarnocki, Z.**, 2003. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications, *Acta Biochim. Pol.*, **50**, 1129-1146.
- [54] **Antolin, I., Rodriguez, C., Sainz, R.M., Mayo, J., Uria, H., Kotler, M.L., Rodriguez-Colunga, M.J., Tolivia, D. and Menendez-Palaez, A.**, 1996. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes, *FASEB J.*, **10**, 882-890.
- [55] **Rodriguez, C., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Antolin, I., Herrera, F., Martin, V. and Reiter, R.J.**, 2004. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role of melatonin, *J. Pineal Res.*, **36**, 1-9.
- [56] **Winiarska, K., Fraczyk, T., Malinska, D., Drozak, J. and Bryla, J.**, 2006. Melatonin mitigates diabetes-induced oxidative stress in rabbits, *J. Pineal Res.*, **40**, 168-176.
- [57] **Leon, J., Acuna-Castroviejo, D., Escames, G., Tan, D.X. and Reiter, R.J.**, 2005. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction, *J. Pineal Res.*, **38**: 1-9.
- [58] **Lopez-Burillo, S., Tan, D.X., Mayo, J.C., Sainz, R.M. and Reiter, R.J.**, 2003. Melatonin, xanthurenic acid resveratrol, EGCG, vitamin C ve alpha-lipoic acid differentially reduce oxidative DNA damage induced by Fenton reagents; a study of their individual and synergistic actions, *J. Pineal Res.*, **34**, 269-277.

- [59] **Tan, D.X., Manchester, L.C., Reiter, R.J., Qi, W., Karbownik, M. and Calvo, J.R.** 2000. Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products, *Biol. Signals Recept.*, **9**, 137-149.
- [60] **Jou, M.J., Peng, T.I., Reiter, R.J., Jou, S.B., Wu, H.Y. and Wen, S.T.**, 2004. Visualization of the antioxidative effects of melatonin at the mitochondrial level during oxidative-stress apoptosis of rat brain astrocytes, *J. Pineal Res.*, **37**, 55-70.
- [61] **Sainz, R.M., Mayo, J.C., Rodriguez, C., Tan, D.X., Lopez-Burillo, S. and Reiter, R.J.**, 2003. Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells, *Cell Mol. Life Sci.*, **60**, 1407-1426.
- [62] **Manev, H., Uz, T. and Ou, T.**, 1998. Early upregulation of hippocampal 5-lipoxygenase following systemic administration of kainate, *Restor. Neural. Neurosci.*, **12**, 81-85.
- [63] **Hsu, C.H., Han, B.C., Liu, M.Y., Yeh, C.Y. and Casida, J.E.**, 2000. Phosphine – induced oxidative damage in rats: attenuation by melatonin, *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 636-642.
- [64] **Montilla, P., Cruz, A., Padillo, F., Tunez, I., Gascon, F., Munoz, M.C., Gomez, M. and Pera, C.**, 2001. Melatonin versus vitamin E as protective treatment against oxidative stress after extra hepatic bile duct ligation in rats, *J. Pineal Res.*, **31**, 138-144.
- [65] **Hassoun, E.A., Li, F., Abushaban, A. and Stohs J.S.**, 2000. The relative abilities of TCDD and its congeners to induce oxidative stress in the hepatic and brain tissues of rats after subchronic exposure, *Toxicology*, **145**, 103-113.
- [66] **Ateşşahin, A., Şahna, E., Türk, G., Çeribaşı, A.O., Yılmaz, S., Yüce, A. ve Bulmuş, Ö.**, 2006. Chemosprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats, *J. Pineal Res.*, **41**, 21-27
- [67] **Jayanthi, M., Raveendran, R. and Basu, D.** 2009., Role of melatonin against oxidative tissue damage induced by *Cleistanthus collinus* in rat brain, *Indian J. Med. Res.*, **130**, 467-47.
- [68] **Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K.**, 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal Biochem.*, **95**, 351-358.
- [69] **Ellman, G.**, 1959. Tissue sulphhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70-77
- [70] **Aebi H.**, 1984. Catalase in vitro assay methods, *Methods Enzymol.*, **105**, 121-126

- [71] **Lowry O.H, Rosebroug N.J, Farr A.L, and Randall R.J.**, 1951. Protein measurement with pholin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- [72] **Hossoun, E.A., Al-Ghafri, M. and Abushaban, A.**, 2003. The role of antioxidant enzymes in TCDD-induced oxidative stres various brain regions of after subchronic exposure, *Free Radical Bio. & Med.*, **35** (9), 1028-1036.
- [73] **Lin, C.H., Juan, S.H., Wang, C.Y., Sun, Y.Y., Chou, C.M., Chang, S.F., Hu, S.Y., Lee, W.S. and Lee, Y.H.**, 2008. Neuronal activity enhances aryl hydrocarbon receptor-mediated gene expression and dioxin neurotoxicity in cortical neurons, *J. Neurochem.*, **104**, 1415-1429.
- [74] **Latchoumycandane, C. and Mathur, P.P.**, 2002. Effects of vitamin on reactive oxygen species-mediated 2,3,7,8- Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin toxicity in rat testis, *J. Appl. Toxicol.*, **22**, 345-351.
- [75] **Latchoumycandane, C., Chita, K.C. and Mathur, P.P.**, 2003. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) induces oxidative stres in the epididymis and epididymal sperm of adult rats, *Arch. Toxicol.*, **77**, 29-41.
- [76] **Trewin, A.L., Woller, M.J., Wimpee, B.A.B., Conley, L.K., Baldrige, M.G. and Hutz, R.J.**, 2007. Short-term hormone release from adult female rat hypothalamic and pituitary explants is not altered by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, *J. Reprod. Develop.*, **53**, 4.
- [77] **Shertzer, H.G., Nebert, D.W., Puga, A., Ary, M., Sonntag, D., Dixon, K., Robinson, L.J., Cianciolo, E. and Dalton, T.P.**, 1998. Dioxin causes a sustained oxidative stres response in the mouse, *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **253**, 44-48.
- [78] **Pohjanvirta, R., Tuomisto, L. and Tuomisto, J.**, 1989. The central nervous system may be involved in TCDD toxicity, *Toxicolog*, **58**, 167-174.
- [79] **Anundi, I., Hogberg, J. and Stead, A.H.**, 1979. Glutathione depletion in isolated hepatocytes: Its relations to lipid peroxidation and cell damage, *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh.)*, **45**, 45-51.
- [80] **Slezak, B.P., Hatch, G.E., Devito, M.J., Diliberto, J.J., Slade, R., Crissman, K., Hossoun, E. and Birnbaum, L. S.**, 2000. Oxidative stress in female B6C3F1 mice following acute and subchronic exposure to 2,3,7,8- tetraklorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), *Toxicol. Sci.*, **54**, 390-398.

- [81] **Comporti, M., Maellaro, E., Del Bello, B. and Casini, A.F.**, 1991. Glutathione depletion: Its effects on other antioxidant systems and hepatocellular damage, *Xenobiotica*, **21**, 1067-1076.
- [82] **Yüce, A., Ateşşahin, A. ve Çeribaşı, A.O.**, 2008. Amelioration of cyclosporine A-induced renal, hepatic and cardiac damages by ellagic acid in rats, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **103**, 186–191.
- [83] **Ferro, Cde O., Chagas, V.L., Oliveira, M.F., De Olivera, P.L. and Schanaider, A.**, 2010. Catalase activity in lung, kidney and small bowel non-ischemic in rats after intestinal reperfusion, *Rev. Col. Bras. Cir.*, **37** , 1-8.
- [84] **Rodriguez, C., Mayo J.C., Sainz, R.M., Antolin, I., Herrera, F., Martin, V. and Reiter, R.J.**, 2004. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin, *J. Pineal Res.*, **36**, 1-9.
- [85] **Tengattini, S., Reiter, R.J., Tan, D.X., Terron, M.P., Rodella, L.F. and Rezzani, R.**, 2008. Cardiovascular diseases: protective effects of melatonin, *J. Pineal Res.*, **44**, 16-25.
- [86] **Tomas-Zapico, C. and Coto-Montes, A.**, 2005. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes, *J. Pineal Res.*, **39**, 119-130.

7. ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında İstanbul'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi İstanbul'da tamamladım. 2002–2007 yılları arasında İnönü Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümü'nde lisans eğitimimi tamamladım. Aynı yıl Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı'nda tezli yüksek lisansa başladım. Yüksek lisans eğitimim sürerken, 2009 Mart ayında Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne araştırma görevlisi olarak atandım. Yüksek Lisans eğitimimi tamamlamak üzere 35. madde ile tekrar Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne araştırma görevlisi olarak geçici görevlendirme ile gönderildim. Halen Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.